

产品手册

H_TNFRSF9(4-1BB) Reporter Jurkat Cell Line

H_TNFRSF9(4-1BB) Reporter Jurkat 细胞系

For research use only!

本品仅供科研使用，严禁用于治疗！

版本号：V2.8.3

目录

一、	产品基本信息及组分.....	3
二、	包装、运输及储存.....	3
三、	产品描述.....	4
四、	材料准备.....	5
1.	细胞培养、冻存、复苏试剂准备.....	5
2.	试剂耗材准备.....	5
五、	细胞复苏、传代、冻存.....	6
1.	H_TNFRSF9(4-1BB) Reporter Jurkat Cell Line 细胞复苏.....	6
2.	H_TNFRSF9(4-1BB) Reporter Jurkat Cell Line 细胞传代.....	6
3.	H_TNFRSF9(4-1BB) Reporter Jurkat Cell Line 细胞冻存.....	6
六、	使用方法.....	7
1.	抗体激动剂验证实验.....	7
1)	加样步骤.....	7
2)	报告基因检测.....	8
3)	验证结果.....	8
2.	配体激动剂验证实验.....	9
1)	加样步骤.....	9
2)	报告基因检测.....	10
3)	验证结果.....	11
3.	抗体激动剂 Crosslink 验证实验.....	12
1)	加样步骤.....	12
2)	报告基因检测.....	14
3)	验证结果.....	14
	使用许可协议:	15

一、 产品基本信息及组分

基本信息

产品编号	产品名称	规格
GM-C09468	H_TNFRSF9(4-1BB) Reporter Jurkat Cell Line	5E6 Cells/mL

组成成分

产品编号	产品名称	规格	数量	储存
GM-C09468	H_TNFRSF9(4-1BB) Reporter Jurkat Cell Line	5E6 Cells/mL	1 管	-196°C

二、 包装、运输及储存

1. 细胞系产品干冰运输，-196°C 以下（冰箱或液氮的气相）长期储存。
2. 接触产品请带手套。请收到产品立即确认产品是否为冻存状态，-196°C 以下（冰箱或液氮的气相）长期储存。
3. 本产品相关 Assay，应在二级生物安全实验室或生物安全柜中进行。

三、 产品描述

4-1BB 又称为 CD137 或 TNFRSF9，是一种可诱导的共刺激受体，属于肿瘤坏死因子受体超家族的成员，在 T 细胞，自然杀伤(NK)细胞和先天免疫细胞中均有表达。4-1BB 与 4-1BB 配体(4-1BBL)的相互作用，能够促进细胞增殖、存活和细胞因子产生。目前针对 4-1BB 的药物研发主要是用于治疗炎症或自身免疫病，以及用于癌症治疗。靶向 4-1BB 的激动型抗体在治疗炎症或自身免疫病方面进展喜人，靶向 4-1BB 和免疫检查点或共刺激靶点的联合疗法将发挥更强的抗肿瘤作用。

吉满生物 H_TNFRSF9(4-1BB) Reporter Jurkat 报告基因细胞系，是基于 4-1BBL/4-1BB 构建的一种 Luciferase 报告基因细胞系。该细胞稳定表达 4-1BB 基因及 Luciferase 报告基因，可用于靶向 4-1BB 的单抗等治疗性抗体的体外激活效果评价。

H_TNFRSF9(4-1BB) Reporter Jurkat Cell Line 可配合 H_FCGR2B CHO-K1 Cell Line (Genomeditech/GM-C16925) 使用，检测抗体与 FcγRIIb 受体交联时，与受体的相互作用，对抗体的 Crosslink 体外激活效果进行评价。

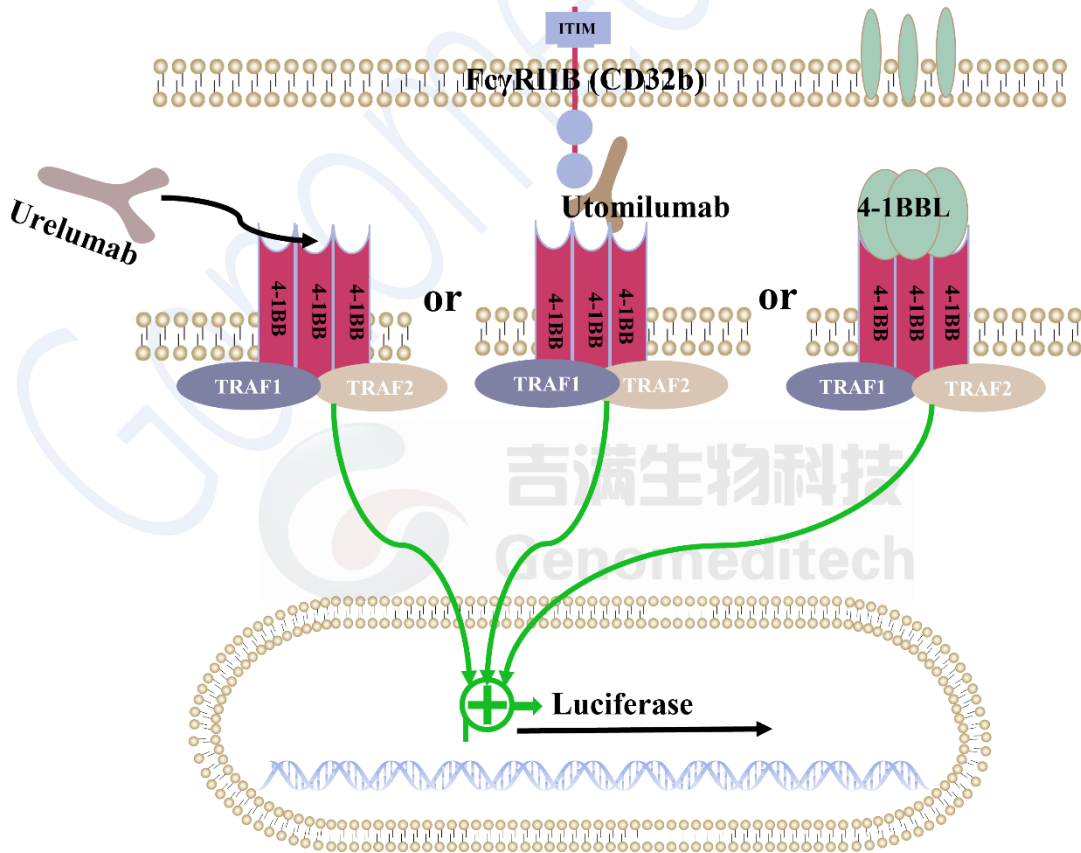


Fig 1. 原理示意图

四、 材料准备

1. 细胞培养、冻存、复苏试剂准备

细胞复苏培养基:	RPMI 1640 +10% FBS +1% P.S
细胞生长培养基:	RPMI 1640 +10% FBS +1% P.S +0.75 µg/mL Puromycin +3.5 µg/mL Blastincidin
细胞冻存培养基:	FBS+10% DMSO
Assay Buffer:	RPMI 1640 +1% FBS +1% P.S

2. 试剂耗材准备

试剂准备

Reagent	Specification	Manufacturer/Catalogue No.
Puromycin	25 mg	Genomeditech/GM-040401-1
Blasticidin	10 mg	Genomeditech/GM-040404-1
Pen/Strep	100 mL	Thermo/15140-122
Fetal Bovine Serum	500 mL	Thermo/10099141
RPMI-1640 medium	500 mL	Biological Industries/01-100-1ACS
H_FCGR2B CHO-K1 Cell Line	5E6 cells/mL	Genomeditech/GM-C21996
Anti-H_TNFRSF9(4-1BB) Antibody(Urelumab)	hIgG4 /	Genomeditech/GM-28954AB
4-1BBL	100 µg	Sino Biological/15693-H01H
CD40L	50 µg	Sino Biological/10239-H08E
Anti-H_4-1BB Antibody(Utomilumab)	hIgG2 /	Genomeditech/GM-26840AB
GMOne-Step Luciferase Reporter Gene Assay Kit	/	Genomeditech/GM-040503

重要仪器

Equipment	Manufacturer/Catalogue No.
细胞计数仪	ThermoFisher Scientific/Countess 3
酶标仪	Moleculardevices/SpectraMax L

五、 细胞复苏、传代、冻存

1. H_TNFRSF9(4-1BB) Reporter Jurkat Cell Line 细胞复苏

- a) 37°C水浴锅预热培养基，加入预热后的完全培养基 5 mL 至 15 mL 离心管。
- b) 从液氮中取出冻存细胞并迅速放入 37°C恒温水浴锅，将细胞液面浸至水面以下不断摇动至融化。
- c) 用 70%乙醇擦拭冻存管外部以降低污染的几率。在生物安全柜或超净台中将冻存管中的细胞悬液转移到步骤 a) 的离心管中，轻轻混匀，1000 rpm，离心 3 min，使细胞沉淀，弃上清。
- d) 使用 1 mL 完全培养基重悬。取出部分使用台盼蓝染色计数活细胞，细胞 $\geq 3 \times 10^6$ cells/mL。
- e) 通过补加培养基的形式调整活细胞密度为 $4-6 \times 10^5$ cells/mL，将细胞悬液接种至 1-2 个 T25 中（3-5 mL 悬液），竖瓶培养。

2. H_TNFRSF9(4-1BB) Reporter Jurkat Cell Line 细胞传代

- a) 当细胞密度达到 $1.5-2 \times 10^6$ cells/mL，1 传 3，隔 2-3 天继续传代，不要让其密度超 2×10^6 cells/mL，推荐使用 T25 瓶进行传代培养。
- b) 该细胞为悬浮细胞，传代时推荐使用【半换液法】对细胞状态较为有利。传代时可以直接向培养瓶中添加新鲜培养液，然后将细胞吹打均匀后移入新的 T25 培养瓶中继续培养。
- c) 注意营养，不处理时务必隔天适当补加培养基。

3. H_TNFRSF9(4-1BB) Reporter Jurkat Cell Line 细胞冻存

- a) 使用 1000 rpm，3 min 离心收集细胞。
- b) 使用预冷细胞冻存液（90% FBS + 10% DMSO）重悬细胞，细胞密度调整为 5×10^6 cells/mL，每管 1 mL 分装到细胞冻存管中。
- c) 拧紧盖子，适当标记后，将冻存管置于梯度降温盒中，-80°C下保存至少 1 天，尽快转移至液氮中。

六、使用方法

1. 抗体激动剂验证实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H_TNFRSF9(4-1BB) Reporter Jurkat 细胞量为 1×10^5 cells/孔。本次实验使用 Anti-H_TNFRSF9(4-1BB) hIgG4 Antibody(Urelumab)（以下简称 Urelumab; 150kDa）作为阳性抗体。以 Urelumab 为例，Conc.01 浓度为 $100 \mu\text{g/mL}$ ，3 倍梯度稀释，Conc.01-Conc.11 分别排布在 B1-B11，B12 为 0 浓度对照。周围孔加入 $100 \mu\text{L}$ PBS，以防止边孔蒸发。

孔板排布如下：

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
B	Urelumab $100 \mu\text{g/mL}$	$33.33 \mu\text{g/mL}$	$11.11 \mu\text{g/mL}$	$3.7 \mu\text{g/mL}$	$1.23 \mu\text{g/mL}$	411.52 ng/mL	137.17 ng/mL	45.72 ng/mL	15.24 ng/mL	5.08 ng/mL	1.69 ng/mL	0
C	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
D												
E												
F												
G												
H												

1) 加样步骤

- 实验前 1-2 h，从细胞培养瓶中转移 H_TNFRSF9(4-1BB) Reporter Jurkat 细胞至 50 mL 离心管中，计算细胞密度及活力。以 Assay Buffer 重悬细胞，调整至 2×10^6 cells/mL。
- 使用无菌 96 孔 V 底板准备药物稀释。
- 对于待测样品，使用一行。
- 母液配置

药物名称	储液	母液	配置方法
Urelumab	0.45 mg/mL	/	直接使用储液

- 加入 Assay Buffer，各孔体积见下表。如 B1 孔中加入 $45.8 \mu\text{L}$ 的 Assay buffer，B2-B12 加入 $55 \mu\text{L}$ 的 Assay buffer。
- 吸取不同体积的待测样品母液，加入到第一个梯度稀释孔中（如 B1）。

母液吸取	梯度稀释孔, 依次从前孔吸取 27.5 μL , 加入次孔											对照孔
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	36.7 μL Urelumab	45.8 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL
C												
D												
E												
F												
G												
H												

- g) 从第一个梯度稀释孔 (如 B1) 中吸取 27.5 μL 液体, 加入到第二个梯度稀释孔中 (如 B2), 充分混匀。
- h) 以此类推, 直至第 11 个梯度稀释孔 (B11)。
- i) 准备 96 圆底孔板, 根据孔板布局, 加入步骤 a 准备好的 H_TNFRSF9(4-1BB) Reporter Jurkat 细胞 50 μL /孔。
- j) 将步骤 h 准备好的梯度稀释液每孔加入 50 μL 。
- k) 盖上检测板盖, 于 37°C CO₂ 培养箱中培养 7 h。
- l) 使用 one-step 报告基因检测试剂盒收样检测 Luciferase。

2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_TNFRSF9(4-1BB) Reporter Jurkat Cell line	0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1.69 ng/mL
	7670	202593	6954

3) 验证结果

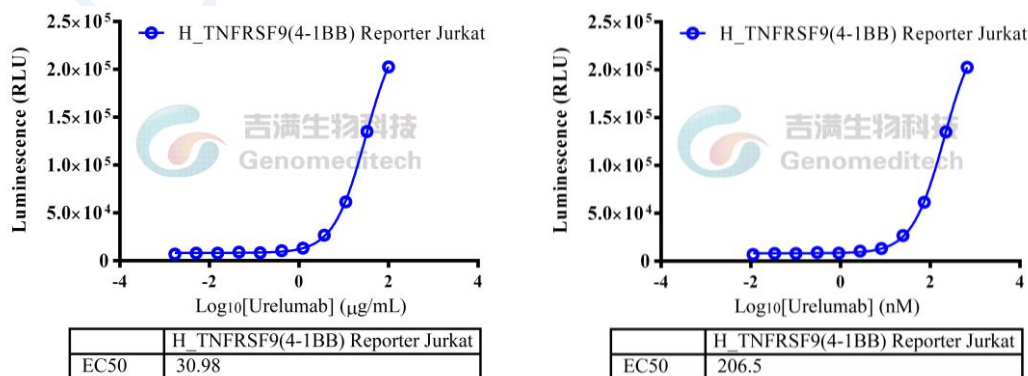


Fig 2. 功能验证结果

(右图对抗体进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)

2. 配体激动剂验证实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H_TNFRSF9(4-1BB) Reporter Jurkat 细胞量为 1×10^5 cells/孔。本次实验使用 4-1BBL (47.9 kDa) 作为阳性配体，CD40L (17.7 kDa) 作为阴性配体。以 4-1BBL 为例，Conc.01 浓度为 15 $\mu\text{g/mL}$ ，3 倍梯度稀释，Conc.01-Conc.09 分别排在 B2-B10，B11 为 0 浓度对照。周围孔加入 100 μL PBS，以防止边孔蒸发。

孔板排布如下：

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	
B	4-1BBL	PBS	15 $\mu\text{g/mL}$	5 $\mu\text{g/mL}$	1.67 $\mu\text{g/mL}$	555.56 ng/mL	185.19 ng/mL	61.73 ng/mL	20.58 ng/mL	6.86 ng/mL	2.29 ng/mL	0	PBS
C	CD40L	PBS	15 $\mu\text{g/mL}$	5 $\mu\text{g/mL}$	1.67 $\mu\text{g/mL}$	555.56 ng/mL	185.19 ng/mL	61.73 ng/mL	20.58 ng/mL	6.86 ng/mL	2.29 ng/mL	0	PBS
D		PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	
E													
F													
G													
H													

1) 加样步骤

- 实验前 1-2 h，从细胞培养瓶中转移 H_TNFRSF9(4-1BB) Reporter Jurkat 细胞至 50 mL 离心管中，计算细胞密度及活力。以 Assay Buffer 重悬细胞，调整至 2×10^6 cells/mL。
- 使用无菌 96 孔 V 底板准备药物稀释。
- 对于待测样品，使用一行（如 B 行，单重复可以检测 6 个药物）。
- 母液配置

药物名称	储液	母液	配置方法
4-1BBL	0.1 mg/mL	/	直接使用储液
CD40L	0.25 mg/mL	/	直接使用储液

- 加入 Assay Buffer，各孔体积见下表。如 B2 孔中加入 57.8 μL 的 Assay buffer，B3-B11 加入 55 μL 的 Assay buffer。
- 吸取不同体积的待测样品母液，加入到第一个梯度稀释孔中（如 B2）。

母液吸取		梯度稀释孔, 依次从前孔吸取 27.5 μ L, 加入次孔										对照孔
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	24.75 μ L 4-1BBL	加入	57.8 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L
C	9.9 μ L CD40L	加入	72.6 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L
D												
E												
F												
G												
H												

- g) 从第一个梯度稀释孔 (如 B2) 中吸取 27.5 μ L 液体, 加入到第二个梯度稀释孔中 (如 B3), 充分混匀。
- h) 以此类推, 直至第 9 个梯度稀释孔 (B10)。
- i) 准备 96 圆底孔板, 根据孔板布局, 加入步骤 a 准备好的 H_TNFRSF9(4-1BB) Reporter Jurkat 细胞 50 μ L, 1×10^5 cells/孔。
- j) 将步骤 g 准备好的梯度稀释液每孔加入 50 μ L。
- k) 盖上检测板盖, 于 37°C CO₂ 培养箱中培养 7 h。
- l) 收样检测 Luciferase。

2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_TNFRSF9(4-1BB) Reporter Jurkat Cell line+4-1BBL	0 μ g/mL	15 μ g/mL	2.29 ng/mL
	4487	19224	5125
H_TNFRSF9(4-1BB) Reporter Jurkat Cell line+CD40L	0 μ g/mL	15 μ g/mL	2.29 ng/mL
	5309	5363	5223

3) 验证结果

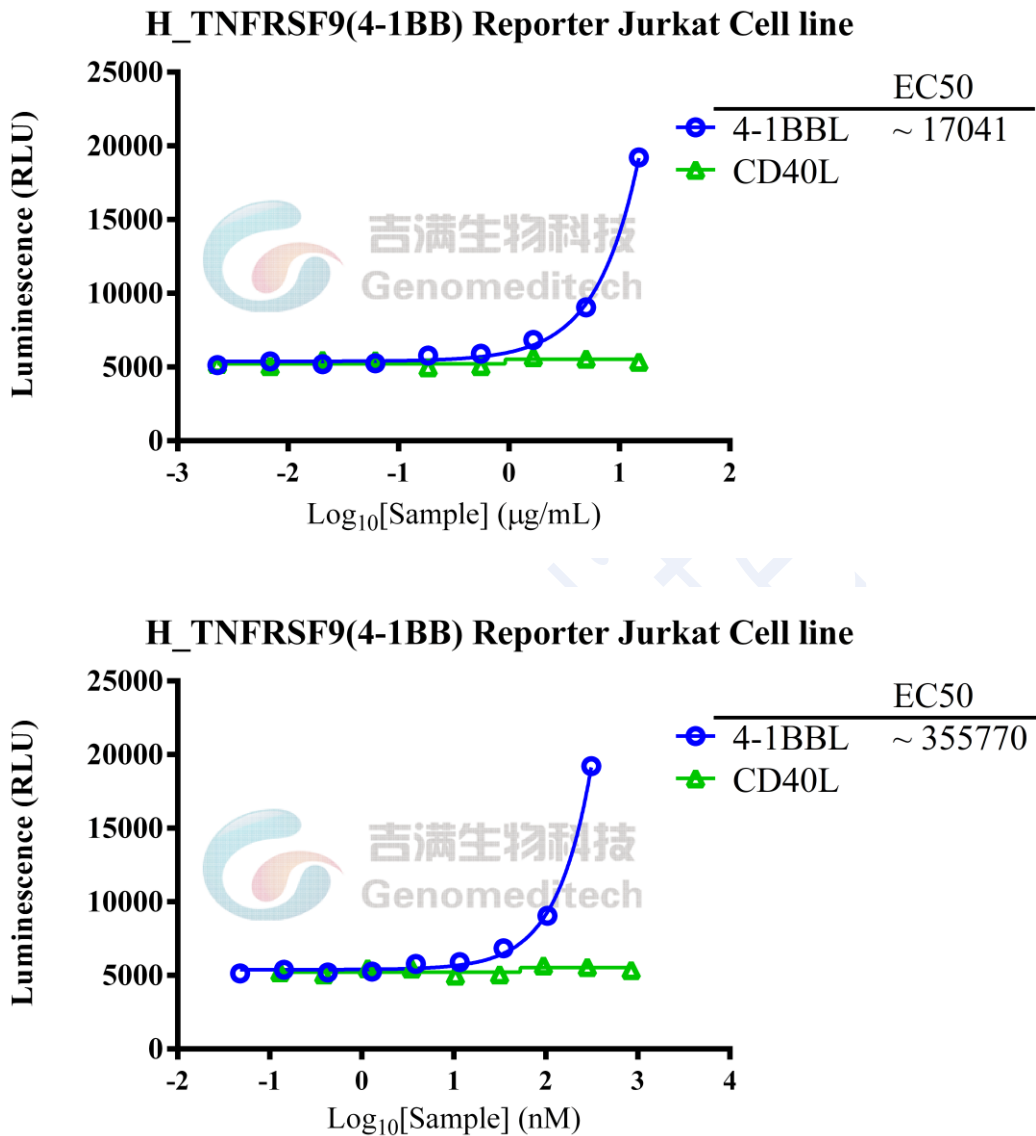


Fig 3.功能验证结果

(下图对药物进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)

3. 抗体激动剂 Crosslink 验证实验

对于本实验，推荐 H_TNFRSF9(4-1BB) Reporter Jurkat Cell line 细胞量为 1×10^5 cells/孔，H_FCGR2B CHO-K1 Cell Line 和 CHO-K1 Cell Line 细胞量各为 1.5×10^4 cells/孔。Anti-H_4-1BB hIgG2 Antibody(Utomilumab) (以下简称为 Utomilumab; 150 kDa) 作为本次实验的抗体，Conc.01 终浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ ，5 倍梯度稀释，Conc.01-Conc.09 分别排布在 B2-B10，B11 为 0 浓度对照。周围孔加入 100 μL PBS，以防止边孔蒸发。

孔板排布如下：

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
B	H_FCGR2B CHO-K1 Cell Line+Utomilumab	100 $\mu\text{g/mL}$	20 $\mu\text{g/mL}$	4 $\mu\text{g/mL}$	800 ng/mL	160 ng/mL	32 ng/mL	6.4 ng/mL	1.28 ng/mL	256 pg/mL	0	PBS
C	CHO-K1 Cell Line+Utomilumab	100 $\mu\text{g/mL}$	20 $\mu\text{g/mL}$	4 $\mu\text{g/mL}$	800 ng/mL	160 ng/mL	32 ng/mL	6.4 ng/mL	1.28 ng/mL	256 pg/mL	0	PBS
D	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
E												
F												
G												
H												

1) 加样步骤

- 在实验前 16-24 h，将靶细胞 H_FCGR2B CHO-K1 Cell Line 和 CHO-K1 从培养瓶中分别消化下来，以新鲜培养基重悬细胞，检测细胞活力并计数。离心收集细胞，再以新鲜培养基调整细胞浓度为 1×10^5 cells/mL。以排枪加 100 μL 细胞/孔至中间孔 (FCGR2B CHO: B2-B10; CHO: C2-C10)。周围的孔加 100 μL PBS。盖上板盖，于孵箱中孵育过夜。
- 实验前 1-2 h，从细胞培养瓶中转移 H_TNFRSF9(4-1BB) Reporter Jurkat Cell line 细胞至 50 mL 离心管中，计算细胞密度及活力。以 Assay Buffer 重悬细胞，调整至 2×10^6 cells/mL。
- 使用无菌 96 孔 V 底板准备药物稀释。
- 对于待测样品，使用一行 (如 B 行，单重复可以检测 6 个药物)。

e) 母液配置

药物名称	储液	母液	配置方法
Utamilumab	3.07 mg/mL	/	直接使用储液

f) 加入 Assay Buffer, 各孔体积见下表。如 B2 孔中加入 64.3 μL 的 Assay buffer, B3-B11 加入 55 μL 的 Assay buffer。

g) 吸取不同体积的待测样品母液, 加入到第一个梯度稀释孔中 (如 B2)。

	母液吸取	梯度稀释孔, 依次从前孔吸取 13.8 μL , 加入次孔										对照孔			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		11	12	
A															
B	4.5 μL Utamilumab	加入	64.3 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL		
C	4.5 μL Utamilumab	加入	64.3 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL		
D															
E															
F															
G															
H															

h) 从第一个梯度稀释孔 (如 B2) 中吸取 13.8 μL 液体, 加入到第二个梯度稀释孔中 (如 B3), 充分混匀。

i) 以此类推, 直至第 9 个梯度稀释孔 (如 B10)。

j) 将步骤 a 孵育过夜的细胞孔板取出, 每孔吸弃 90 μL 培养基。

k) 加入步骤 b 准备好的 H_TNFRSF9(4-1BB) Reporter Jurkat 细胞 50 μL , 1×10^5 cells/孔。

l) 将步骤 i 准备好的抗体梯度稀释液每孔加入 50 μL 。

m) 盖上检测板盖, 于 37°C CO₂ 培养箱中培养 6 h。

n) 使用 one-step 报告基因检测试剂盒收样检测 Luciferase。

2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_TNFRSF9(4-1BB) Reporter Jurkat Cell line+Utomilumab+CHO FCGR2B	0 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	256 pg/mL
	7915	1620511	8384
H_TNFRSF9(4-1BB) Reporter Jurkat Cell line+Utomilumab+CHO	0 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	256 pg/mL
	10829	18061	11356

3) 验证结果

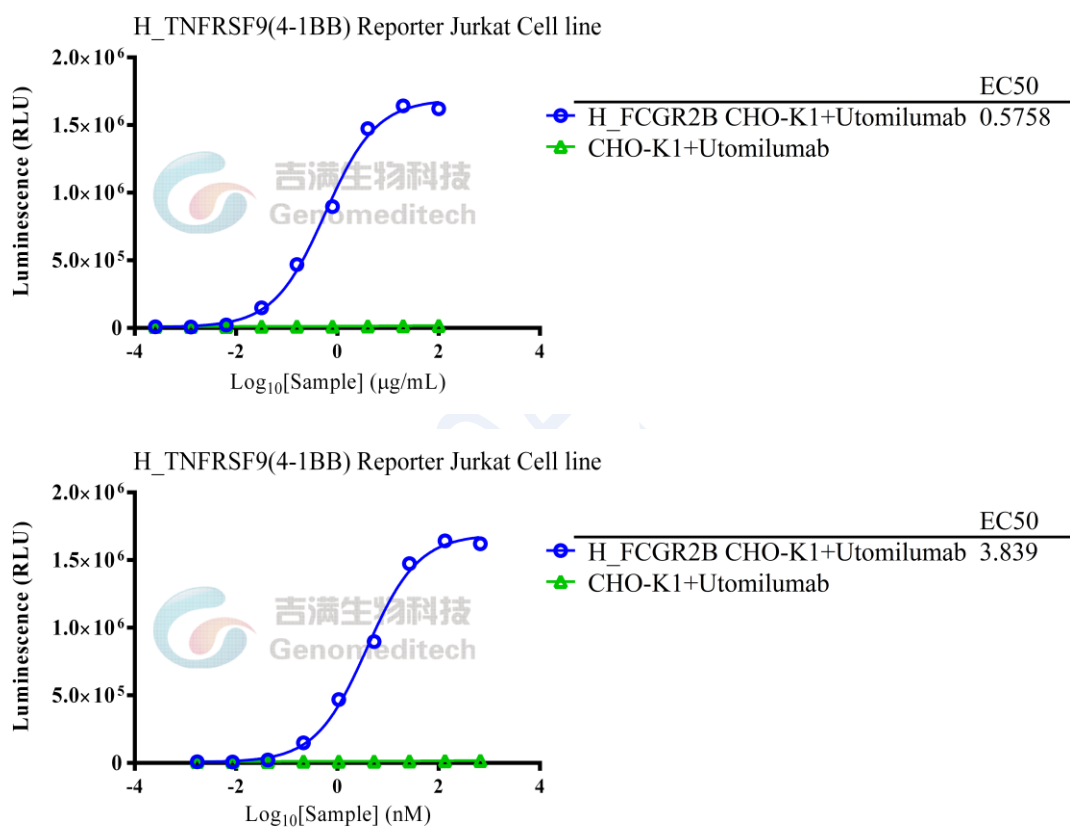


Fig 4.功能验证结果

(下图对抗体进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)

使用许可协议:

吉满生物将其许可材料的所有知识产权，独占的、不可转让的和不可发放分许可的权利授予给被许可人；吉满生物将保留许可材料、细胞系历史包、子代、包括修改材料中许可材料的所有权。

在吉满生物和被许可方之间，被许可方不允许以任何方式修改细胞系。被许可方不得分享、分发、出售、再授权或以其他方式将被许可材料、子代提供给其它实验室、部门、研究机构、医院、大学或生物技术公司等第三方非基于外包被许可人的研究目的而使用。

详情请参考吉满细胞系授权协议。

Genomeditech